



ACKNOWLEDGEMENT RECEIPT

DATE: 07 FEB 2005

WIPO PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

17 JAN. 2005

Fait à Paris, le _____

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

DOCUMENT DE PRIORITÉ

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS
CONFORMÉMENT À LA
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23
www.inpi.fr

BEST AVAILABLE COPY



BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ

26bis, rue de Saint-Petersbourg
75800 Paris Cédex 08
Téléphone: 01 53.04.53.04 Télécopie: 01.42.94.86.54

Code de la propriété intellectuelle-livre VI

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

| | |
|--|--|
| DATE DE REMISE DES PIÈCES: N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL: DÉPARTEMENT DE DÉPÔT: DATE DE DÉPÔT: | Stéphane PALIX Cabinet LAURENT & CHARRAS 20 Rue Louis Chirpaz B.P. 32 69131 ECULLY CÉDEX France |
| Vos références pour ce dossier: G143-B-19925 FR | |

| | |
|--|---|
| 1 NATURE DE LA DEMANDE | |
| Demande de brevet | |
| 2 TITRE DE L'INVENTION | |
| | Particules virales contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus et procédé de préparation de ladite particule virale. |
| 3 DECLARATION DE PRIORITE OU REQUETE DU BENEFICE DE LA DATE DE DEPOT D'UNE DEMANDE ANTERIEURE FRANCAISE | Pays ou organisation Date N° |
| 4-1 DEMANDEUR | |
| Nom Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF | GENETHON 1 bis Rue de l'Internationale 91000 EVRY France France Association (Loi de 1901) 402 187 520 731Z |
| 4-2 DEMANDEUR | |
| Nom Rue Code postal et ville Pays Nationalité Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF | UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS 3 Rue des Tanneurs B.P. 4103 37041 TOURS CÉDEX 1 France France Université publique à caractère scientifique et culturel 193 708 005 803Z |

| | | | | |
|--|---------------------------------|--------|-------------------|-----------------|
| 5A MANDATAIRE | | | | |
| Nom | PALIX | | | |
| Prénom | Stéphane | | | |
| Qualité | CPI: 99-305, Pas de pouvoir | | | |
| Cabinet ou Société | Cabinet LAURENT & CHARRAS | | | |
| Rue | 20 Rue Louis Chirpaz B.P. 32 | | | |
| Code postal et ville | 69131 ECULLY CÉDEX | | | |
| N° de téléphone | 04.78.33.16.60 | | | |
| N° de télécopie | 04.78.33.13.82 | | | |
| 6 DOCUMENTS ET FICHIERS JOINTS | | | | |
| | Fichier électronique | Pages | Détails | |
| Texte du brevet | textebrevet.pdf | 26 | D 21, R 4, AB 1 | |
| Dessins | dessins.pdf | 2 | page 2, figures 5 | |
| Listage des sequences, PDF | seqpdf.pdf | | | |
| Listage des sequences, ASCII | seqtxt.txt | | | |
| 7 MODE DE PAIEMENT | | | | |
| Mode de paiement | Prélèvement du compte courant | | | |
| Numéro du compte client | 272 | | | |
| 8 RAPPORT DE RECHERCHE | | | | |
| Etablissement immédiat | | | | |
| 9 REDEVANCES JOINTES | | | | |
| | Devise | Taux | Quantité | Montant à payer |
| 062 Dépôt | EURO | 0.00 | 1.00 | 0.00 |
| 063 Rapport de recherche (R.R.) | EURO | 320.00 | 1.00 | 320.00 |
| 068 Revendication à partir de la 11ème | EURO | 15.00 | 14.00 | 210.00 |
| Total à acquitter | EURO | | | 530.00 |

La loi n°78-17 du 6 janvier 1978 relative à l'informatique aux fichiers et aux libertés s'applique aux réponses faites à ce formulaire.
Elle garantit un droit d'accès et de rectification pour les données vous concernant auprès de l'INPI.

Signé par

Signataire: FR, Cabinet Laurent &
Charras, S.Palix

Fonction

Mandataire agréé (Mandataire 1)



BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Réception électronique d'une soumission

Il est certifié par la présente qu'une demande de brevet (ou de certificat d'utilité) a été reçue par le biais du dépôt électronique sécurisé de l'INPI. Après réception, un numéro d'enregistrement et une date de réception ont été attribués automatiquement.

Demande de brevet : X

Demande de CU :

| | | |
|---|-----------------------------------|------------------------------|
| DATE DE RECEPTION | 2 décembre 2003 | |
| TYPE DE DEPOT | INPI (PARIS) - Dépôt électronique | Dépôt en ligne: X |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL ATTRIBUE PAR L'INPI | 0350951 | Dépôt sur support CD: |
| Vos références pour ce dossier | G143-B-19925 FR | |

DEMANDEUR

| | |
|-----------------------------|----------|
| Nom ou dénomination sociale | GENETHON |
| Nombre de demandeur(s) | 2 |
| Pays | FR |

TITRE DE L'INVENTION

Particules virales contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus et procédé de préparation de ladite particule virale.

DOCUMENTS ENVOYES

| | | |
|-----------------------------|----------------------------|-----------------|
| package-data.xml | Requetefr.PDF | fee-sheet.xml |
| FR-office-specific-info.xml | ValidLog.PDF | seq1.txt |
| dessins.pdf | application-body.xml | textebrevet.pdf |
| seq1.pdf | indication-bio-deposit.xml | request.xml |

EFFECTUE PAR

| | |
|--|---|
| Effectué par: | S.Palix |
| Date et heure de réception électronique: | 2 décembre 2003 10:01:37 |
| Empreinte officielle du dépôt | 2B:2F:71:35:2C:FB:37:25:F0:D8:73:54:22:21:3A:12:11:DC:41:2A |

/ INPI PARIS, Section Dépôt /

SIEGE SOCIAL
INSTITUT 26 bis, rue de Saint-Petersbourg
NATIONAL DE 75800 PARIS cedex 08
LA PROPRIÉTÉ Téléphone : 01 53 04 53 04
INDUSTRIELLE Télécopie : 01 42 93 69 30

PARTICULES VIRALES CONTENANT UN VECTEUR DERIVE
D'ALPHA VIRUS ET PROCEDE DE PREPARATION DE LADITE
PARTICULE VIRALE

- 5 L'invention concerne de nouvelles particules virales contenant un vecteur dérivé d'un alpha-virus rendu défectif pour une propagation autonome et donc pour la réplication. Elle se rapporte également au procédé de préparation desdites particules.
- 10 Dans la suite de la description, l'invention est plus particulièrement illustrée en relation avec le virus de la forêt de Semliki (SFV) entrant dans la catégorie des alpha-virus. Bien entendu, cet exemple particulier ne limite en rien la portée de l'invention et tous les alpha-virus peuvent être envisagés, tels que par exemple le virus Sindbis.
- 15
- Le génome des alpha-virus se présente sous la forme d'un ARN simple brin de polarité positive comprenant deux phases ouvertes de lecture, respectivement une première phase codant les protéines à fonction enzymatique, et une seconde phase codant les protéines structurales. La réplication s'effectue dans
- 20 le cytoplasme de la cellule. Dans la première étape du cycle infectieux, l'extrémité 5' de l'ARN génomique est traduite en une polyprotéine (nsP 1-4) à activité RNA-polymérase produisant un brin négatif complémentaire de l'ARN génomique. Dans une seconde étape, le brin négatif est utilisé comme matrice pour la production de deux ARN, respectivement :
- 25
- un ARN génomique positif correspondant au génome des virus secondaires produisant, par traduction, d'autres protéines nsP et servant de génome aux virus,
 - un ARN sub-génomique codant les protéines de structure du virus formant les particules infectieuses.

Plus précisément, l'ARN sub-génomique est transcrit à partir du promoteur p26S présent au niveau de l'extrémité 3' de la séquence ARN codant la protéine nsp4. Le rapport ARN génomique positif / ARN sub-génomique est
5 régulé par l'auto-clivage protéolytique de la polyprotéine en nsp 1, nsp 2, nsp 3 et nsp 4. En pratique, l'expression des gènes viraux se déroule en deux phases. Dans une première phase, il y a synthèse principale de brins génomiques positifs et de brins négatifs. Pendant la seconde phase, la synthèse d'ARN sub-génomique est quasiment exclusive conduisant ainsi à la production de
10 protéines structurales en très grande quantité.

La connaissance du mode de répllication des alpha-viridae et la simplicité de leur génome a conduit à l'émergence de systèmes de transfert de gènes utilisant ces virus, ces derniers permettant d'obtenir une forte expression du transgène
15 dans la cellule cible.

L'une des conditions incontournables pour qu'un vecteur dérivé d'alpha-virus puisse être utilisé en thérapie génique est qu'il ne présente aucune capacité à se répliquer. Plusieurs solutions ont été proposées pour rendre le virus Semliki
20 défectif pour la répllication.

La première solution consiste à déléter les gènes de structure de l'ARN de Semliki au profit du transgène, le transgène étant placé sous la dépendance du promoteur p26S. Un tel vecteur peut être transféré sur des cellules sous forme
25 d'ARN ou sous forme d'ADN. Toutefois, cette solution est peu intéressante pour les applications *in vivo*, dans la mesure où l'on observe une faible efficacité de transfert à l'aide de ces éléments génétiques utilisés en l'absence de particules.

Une autre solution consiste à infecter les cellules cibles avec un vecteur Semliki non pas sous forme d'ADN ou d'ARN seul, mais sous forme de particules virales recombinantes. Pour ce faire, on transfecte une lignée cellulaire par au moins deux plasmides, respectivement, un plasmide portant
5 l'ARN du vecteur Semliki dénué de gènes de structure et un second plasmide portant les gènes de structure de Semliki sous la dépendance du promoteur p26S. Au sein de la cellule sont formées des particules virales qui n'encapsident que l'ARN défectif, c'est-à-dire l'ARN de Semliki portant le transgène puisque lui seul porte également une séquence d'encapsulation
10 contenue dans la séquence de la nsP2. Même si, en théorie, ce procédé ne génère aucune particule répliquative, les événements de recombinaison restent fréquents du fait, notamment, du chevauchement des séquences de complémentation et du virus recombinant, et de l'abondance des ARN viraux dans le cytoplasme des cellules productrices.

15

Les documents Rolls (1, 2) décrivent un vecteur SFV dont le génome a été modifié par remplacement des gènes structuraux par le gène codant l'enveloppe VSV-G, éventuellement associé à un transgène. Les particules infectieuses ainsi obtenues sont donc constituées d'une enveloppe VSV-G et
20 contiennent un vecteur dérivé d'alpha-virus. Cependant, le système décrit est particulièrement dangereux du fait de son aptitude à se répliquer de manière autonome.

En d'autres termes, le problème que se propose de résoudre l'invention est
25 d'améliorer le mode de mobilisation des vecteurs dérivés d'alpha-virus, en particulier du virus de la forêt de Semliki (SFV), de manière à éviter tout risque de recombinaison au sein des lignées productrices pouvant générer des particules répliquatives.

Un autre problème que se propose de résoudre l'invention est de préparer des particules virales contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus, dont le tropisme ne soit pas limité aux cellules cibles des virus sauvages.

- 5 Le Demandeur a réussi à produire des particules virales qui répondent simultanément aux deux objectifs ci-dessus en exprimant en *trans*, dans une lignée cellulaire, les gènes codant des éléments structuraux non issus de l'alpha-virus et le vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication.
- 10 Selon un premier mode de réalisation, les gènes codant des éléments structuraux non issus de l'alpha-virus correspondent au seul gène *ENV* du virus de la stomatite vésiculeuse codant la protéine d'enveloppe VSV-G.
- 15 L'utilisation d'une enveloppe VSV-G présente plusieurs avantages. Tout d'abord, la protéine d'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse permet un mode d'entrée cellulaire par endocytose superposable à celui des alpha-virus. En outre, la VSV-G est une protéine très stable, susceptible d'être concentrée par ultra-centrifugation et permettant d'envisager des administrations parentérales. Par ailleurs, cette protéine confère un très large tropisme aux
20 particules qui la contiennent, élargissant ainsi le champ d'utilisation des particules virales de l'invention à des organismes aussi différents que la drosophile et les mammifères.
- 25 Selon ce premier mode de réalisation, l'expression en *trans* est obtenue par co-transfection avantageusement effectuée en deux étapes distinctes respectivement, la transfection de la lignée par le plasmide exprimant le gène de l'enveloppe VSV-G, puis une seconde transfection par le vecteur dérivé

d'alpha-virus. En pratique, la co-transfection est effectuée sur des cellules 293T.

Dans un second mode de réalisation, les gènes codant des éléments structuraux
5 non issus de l'alpha-virus correspondent aux gènes codant les protéines
structurales d'un rétrovirus.

Dans ce cas, l'expression en *trans* est obtenue par transfection d'une lignée
cellulaire d'encapsidation, productrice de rétrovirus défectifs pour la
10 réplication, par le vecteur dérivé d'alpha-virus. Ce type de lignée est bien
connu de l'homme du métier, par exemple le système Phoenix®
(http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html). On peut
utiliser en particulier des lignées d'encapsidation utilisant des gènes
structuraux du MLV (murine leukemia virus).

15

De manière connue, ces lignées sont obtenues par transfection stable d'un
premier plasmide exprimant les gènes *GAG-POL* et d'un second plasmide
exprimant un gène *ENV* de rétrovirus ou d'un autre virus enveloppé (3).

20 Toutefois, il est également envisageable de préparer les particules virales par
triple transfection d'une lignée cellulaire, par exemple des cellules 293T, par
introduction d'un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de
rétrovirus, d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus et du
vecteur dérivé d'alpha-virus.

25

Il est possible d'accentuer davantage encore le caractère défectif des séquences
rétrovirales transcomplémentantes par mutation, notamment délétion des
séquences nucléotidiques du gène *POL* codant l'intégrase (*IN*) et la
transcriptase inverse (*RT*).

Dans les deux modes de réalisation de l'invention tels que précédemment décrits, le vecteur dérivé d'alpha-virus est rendu défectif pour la réplication. Cette propriété est en pratique obtenue par la délétion des gènes de structure
 5 ou leur substitution au profit du(des) transgène(s) d'intérêt dans le génome du vecteur.

Selon une autre caractéristique, le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient un signal permettant l'encapsidation par la particule virale, appelé
 10 séquence psi.

Selon un premier mode de réalisation, la séquence psi correspond à la séquence de packaging étendue des vecteurs MLV, obtenue par amplification selon la méthode PCR (polymerase chain reaction) du vecteur PLNCX
 15 (Clontech®) à partir des amorces :

- amorce 5': LNCX Psi 2a: 5'- GGGACCACCGACCCACCACC -3' (SEQ ID1) et
- amorce 3': LNCX Psi 2b: 5'- GATCCTCATCCTGTCTCTTG -3' (SEQ ID 2).

20

Avantageusement, la séquence psi est réduite en taille et correspond à la séquence minimale. Cette modification est intéressante dans la mesure où la séquence psi peut avoir une fonction de point d'ancrage pour l'entrée des ribosomes (IRES). La fonction IRES permet ainsi de supprimer le promoteur
 25 p26S du SFV, de sorte que la traduction du transgène est obtenue à partir de l'ARN génomique.

Paradoxalement, le Demandeur a également démontré que la présence d'un signal d'encapsidation rétroviral n'était pas forcément nécessaire. En effet, la

- quantité d'ARN recombinants, du vecteur Semliki, retrouvée dans le cytoplasme des cellules transfectées est telle que ces derniers sont préférentiellement encapsidés dans les particules rétrovirales. Ce phénomène est accentué par l'extinction des gènes cellulaires, induite par l'expression des
- 5 protéines non structurales du virus Semliki. La localisation sub-cellulaire des complexes de réplication du virus SFV pourrait également jouer un rôle important (4). Dès lors, et dans un mode de réalisation préféré, le génome du vecteur est dénué de séquence psi.
- 10 Le Demandeur a par ailleurs constaté que le mode de transfection généralement utilisé pour les ARN recombinants des vecteurs Semliki, à savoir l'électroporation, entraînait une souffrance cellulaire importante. Aussi, et pour permettre la transfection des cellules productrices par des méthodes plus douces que l'électroporation, le vecteur dérivé d'alpha-virus a été modifié pour
- 15 être exprimé à partir d'un promoteur eucaryote, par exemple un promoteur CMV positionné en 5' de la séquence du vecteur.

Enfin, le promoteur p26S du vecteur d'alpha-virus est avantageusement muté. Le vecteur SFV 26Sm2, et dans une moindre mesure le vecteur SFV 26Sm1,

20 n'exprime plus d'ARN sub-génomique détectable, susceptible de diminuer l'encapsidation des ARN génomiques par compétition.

Ainsi, une particule selon l'invention correspond à une particule virale constituée d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un

25 vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux, les éléments structuraux de ladite particule n'étant pas codés par le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus.

Par ailleurs, l'invention concerne l'utilisation des particules virales selon l'invention pour infecter des cellules. Le Demandeur a montré que les particules ainsi produites pouvaient infecter une grande variété de cellules eucaryotes, aussi bien humaines que non humaines.

5

L'invention se rapporte également à une composition pharmaceutique comprenant les particules virales de l'invention.

De même, elle se rapporte à l'utilisation des particules virales pour la
10 préparation d'un médicament destiné au traitement du cancer.

L'invention et les avantages qui en découlent ressortiront bien des exemples suivants.

15 La figure 1 est une représentation schématique de la structure du vecteur dérivé du virus de la forêt de Semliki (SFV).

La figure 2 montre les mutations effectuées dans le promoteur p26S. Les mutations introduites dans les mutants p26Sm1 et p26Sm2 par rapport à la séquence sauvage (Wt) sont encadrées. L'acide aminé en gras indique un
20 changement dans la séquence codante.

La figure 3 est le résultat d'un Northern-blot effectué à partir de cellules productrices, exprimant des vecteurs SFV modifiés (1:pEGFPC1; 2:p26Sm1; 3:p26Sm2; 4:SFV sans transgène), avec une sonde GFP de pEGFPC1.

La figure 4 montre la capacité des cellules 293T et BHK 21 à exprimer les
25 vecteurs dérivés du SFV (p26Sm1 et p26Sm2) et mobilisés par les pseudo-particules VSV-G.

La figure 5 est le résultat d'un northern blot effectué à partir des cellules infectées par le surnageant de cellules 293 T transfectées par le plasmide

pMDG et des vecteurs SFV modifiés (1:pEGFPC1; 2:p26Sm1; 3:p26Sm2), avec une sonde GFP de pEGFPC1.

EXEMPLE 1 : Production de particules virales à partir de lignées

5 **cellulaires exprimant l'enveloppe VSV-G**

I/ METHODES

I/ Lignées et cultures cellulaires

- 10 - 293T/17 : lignée primaire de reins embryonnaires humains (ATCC CRL-11268),
 - Hela : lignée cellulaire humaine (ATCC CCL-2),
 - QM7 : lignée de muscle de caille (ATCC, CRL-1962),
 - LMH : lignée de foie de poulet (ATCC CRL-2117).

15

Les quatre lignées cellulaires ci-dessus sont cultivées dans du DMEM (Invitrogen) contenant 10 % de sérum de veau fœtal (FCS) (Biowest).

- HepG2 : lignée d'hépatome humain cultivée dans du EM contenant 10 % de FCS (ATCC HB-8065),
20 - BHK21 : lignée de rein de bébé hamster cultivée dans du GMEM contenant 5 % de FCS et 8 % de solution liquide de tryptose phosphate (ATCC CCL-10),
 - CESC : Embryon de poulet obtenu et cultivé selon la référence 26,
 - Cellule High Five cultivée à 27°C dans un milieu de cellules d'insectes
25 de Grace (Grace's insect medium) (cat n° B85502 Invitrogen) contenant 10 % de FCS,
 - Sp2/O : Lignée murine de lymphoplastoïdes cultivée dans du RPMI 1640 contenant 10 % de FCS (ATCC CRL1581).

2/ Construction du vecteur SFV

La structure du vecteur SFV est représentée sur la figure 1.

a/ Vecteur 26Sm1

- 5 Le promoteur interne 26S du SFV est muté par PCR à partir du vecteur pSFV1 (Invitrogen), lequel est dénué de gènes de structure et utilisé comme matrice en présence de deux amorces, respectivement :
 - une amorce 26Sm1F contenant le site de restriction Bgl II apparaissant en gras dans la séquence suivante : 5'-ATCCTCGAAGATCTAGGG-3' (SEQ ID3),
 - 10 - une seconde amorce mutée 26Sm1R contenant le site de restriction Cla I apparaissant en gras dans la séquence suivante :
5'-CAATATCGAT TACTAGCGAACTAATCTAGGA-3' (SEQ ID4).
- 15 Des mutations silencieuses sont ensuite introduites dans le promoteur p26S pour conduire au promoteur p26Sm1 comme représenté sur la figure 2. Le produit ainsi amplifié est ensuite cloné dans un plasmide pIRES2-EGFP (Invitrogen) (figure 1). Une séquence rétrovirale désignée RS, dérivée d'un virus MLV est alors insérée entre le promoteur muté 26S et la séquence IRES.
- 20 Les fragments contenant la séquence 26S mutée, la séquence rétrovirale de MLV et le gène EGFP sont ensuite excisés par Bgl II et Hpa I puis clonés dans le vecteur pSFV1 entre les sites de restriction Bgl II et Sma I. Le fragment de 10,5 kpb contenant le réplicon SFV modifié est enfin cloné entre le promoteur IE CMV et le signal de polyadénylation SV40 pA dans un vecteur pIRES2-
- 25 EGFP dans lequel la séquence IRES GFP a été déléetée.

b/ Vecteur SFV26Sm2

Le promoteur interne est muté par PCR à partir du plasmide SFV1 utilisé comme matrice en présence de deux amorces respectivement, une première
amorce 26Sm1F et une seconde amorce 26Sm2R contenant un site de
5 restriction apparaissant en gras dans la séquence suivante :

5'-ATATCGATTACTAGCGAACTAATCTACGACCCCCGTAAAGGTGT-
3' (SEQ ID5).

L'amorce 26Sm2R conduit aux modifications du promoteur p26S comme
illustré sur la figure 2. Le produit amplifié est ensuite digéré par Bgl II et Cla I
10 et ligué dans le vecteur 26Sm1 également digéré par Bgl II et Cla I pour
supprimer le fragment correspondant.

3/ Transfection de la lignée cellulaire 293T par les vecteurs SFV 26Sm1 ou 26Sm2 et le plasmide pMDG et collecte des particules virales

15 Une transfection transitoire de cellules 293T au moyen d'un kit de transfection
calcium / phosphate (Invitrogen) est effectuée. Les cellules 293T sont
ensemencées à raison de 8.10^5 cellules par puits sur des plaques 6 puits et
incubées à 37°C pendant une nuit, avant transfection. La transfection est
effectuée en deux étapes. Le premier jour, les cellules 293T sont transfectées
20 par 5 µg d'un plasmide pMDG contenant le gène codant pour l'enveloppe
VSV-G, sous l'influence d'un promoteur IE CMV (5). Dans une seconde étape,
le deuxième jour, les cellules sont transfectées par 5 µg des vecteurs SFV
26Sm1 ou 26Sm2. Le second milieu de transfection est laissé au contact des
cellules entre 13 et 17-heures. Au jour No. 3, le milieu est retiré et remplacé
25 par du milieu frais permettant la libération des particules infectantes. Le milieu
de culture contenant les particules virales est collecté 5 à 6 heures plus tard.

4/ Infection des lignées cellulaires par les particules virales

Le surnageant des lignées cellulaires 293T transfectées est collecté puis filtré sur filtre 0,45 µm (HA Millex[®], Millipore) puis incubé avec différentes lignées cellulaires, en présence d'un milieu frais contenant du polybrène, utilisé à raison de 5 µg par ml (Sigma). Le contrôle de l'expression de la GFP dans les cellules infectées est effectué au moyen d'un microscope IX50 Olympus à fluorescence. La quantification de la transfection est effectuée au moyen d'un cytomètre de flux FACScalibur[®] de Becton Dickinson. Pour les tests contrôles, les surnageants sont utilisés dans différents réactifs :

- 10 µg par ml de RNase A (Sigma),
- 1 µg par millilitre d'actinomycine D (Sigma),
- 100 unités par millilitre de DNase I (Invitrogen),
- 1 mg par millilitre de généticine (Sigma), et
- 3 µg par millilitre de puromycine (Cayla).

5/ Concentration des particules virales

Le surnageant des cellules 293 transfectées est centrifugé à 150 000 g dans un rotor SW41 pendant une heure à 4°C. Les virus concentrés sont remis en suspension dans 300 µl de PBS et 25 µl de la solution sont utilisés pour infecter $5 \cdot 10^5$ cellules (293T, BHK-21, Hela, HepG2, Sp2/O, LMH, QM7).

6/ Northern Blot

L'ARN des 10^6 cellules transfectées ou infectées est extrait au moyen d'un système d'isolation d'ARN total (Promega[®]). L'ARN de cellules 293T non transfectées est extrait en tant que contrôle. 2 µg de chaque ARN est soumis à une électrophorèse sur un gel dénaturant, formaldéhyde, et l'ARN est transféré sur une membrane nylon chargée positivement (Hybond-XL ; Amersham). L'hybridation du Northern Blot est effectuée selon les procédures standard. Les sondes correspondent à un fragment de 790 bp Age I-BamH I GFP du

plasmide pEGFPC1 (Clontech), le fragment étant marqué (Rediprime® II DNA labelling system ; Amersham) et purifié sur colonne (ProbeQuant® G-50 Micro Columns ; Amersham) avant utilisation.

5 II/ RESULTATS

1/ Fonctionnalité des vecteurs

Les vecteurs SFV 26Sm1 et 26Sm2 correspondent à des vecteurs SFV, dont le promoteur 26S a été muté dans le but d'éviter une éventuelle compétition entre
10 l'empaquetage de l'ARN génomique du SFV et l'ARN sub-génomique produit par transcription sous l'influence du promoteur 26S. La fonctionnalité des deux vecteurs a été contrôlée par transfection de cellules 293T. L'expression intense de la GFP observée suggère que la transcription et la traduction du vecteur SFV modifié sont correctes. Ce premier résultat est ensuite confirmé par
15 analyse sur Northern Blot à partir de l'ARN extrait des cellules 293 transfectées par le vecteur SFV 26Sm1.

Comme le montre la figure 3, ligne 2, la sonde GFP révèle l'existence de deux bandes correspondant à de l'ARN génomique et de l'ARN sub-génomique, ce
20 dernier suggérant que le promoteur 26S est encore fonctionnel.

Le même test est réalisé sur le second vecteur SFV 26Sm2 comportant des mutations supplémentaires. La détection de la GFP et l'analyse par Northern Blot confirment que les mutations apportées dans le promoteur 26Sm2
25 inhibent la production par transcription, de l'ARN sub-génomique (voir figure 3, ligne 3).

2/ Production de particules virales

Des cellules 293T sont co-transfectées par le plasmide pMDG, puis le vecteur SFV 26Sm1 ou SFV 26Sm2 comme indiqué précédemment. Le surnageant des cellules transfectées est transféré sur des cellules fraîches 293T ou des cellules BHK 21. La forte et rapide expression de la GFP obtenue montre qu'il est possible de mobiliser des vecteurs SFV au moyen de cellules exprimant l'enveloppe VSV-G (figure 4).

3/ Capacité des particules virales obtenues à infecter les lignées cellulaires BHK21, 293T et QM7

Les résultats sont reportés dans le tableau ci-après.

Les titres viraux sont détectés 24 heures après infection par analyse FACS. Le pourcentage de cellules exprimant la GFP, rapporté au nombre de cellules au jour de l'infection, permet de calculer un titre de particules recombinantes (IP/ml).

| Lignées cellulaires | Titre viral 26Sm1 (IP/ml) | Titre viral 26Sm2 (IP/ml) | Particules 26Sm2 concentrées (IP/ml) |
|---------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------------------|
| BHK21 | 1.1×10^6 | 0.9×10^6 | 10^7 |
| 293T | 1.5×10^5 | 1.5×10^5 | 5×10^6 |
| QM7 | 3×10^5 | 3×10^5 | ND |

Tableau 1

Comme le montre ce tableau, le titre le plus élevé est obtenu avec les cellules BHK21 comparées aux cellules 293T et QM7.

4/ L'expression de la GFP contenant les cellules cibles est due à une véritable transduction par les particules virales SFV

Pour s'assurer que l'expression de la GFP est due à l'expression des vecteurs SFV et non à la mobilisation de plasmides issus de la transfection initiale ou
5 d'une pseudo-transduction de GFP libre, les contrôles suivants sont effectués.

Tout d'abord, l'ARN de SFV est détecté par Northern Blot à partir d'ARN extrait des cellules infectées (voir figure 5). Comme pour les cellules productrices, on observe dans les cellules infectées par le vecteur SFV 26Sm1,
10 à la fois de l'ARN génomique et de l'ARN sub-génomique. Au contraire, dans les cellules infectées avec le vecteur SFV 26Sm2, seul l'ARN génomique est détecté. L'intensité du signal suggère une répllication intense des vecteurs SFV. Cependant, pour s'assurer que la forte expression de la GFP dans les cellules cibles correspond bien à la mobilisation de l'ARN de SFV, et donc que les
15 plasmides ont bien été transférés dans les cellules cibles, en l'espèce les cellules 293T, de la DNase I à haute concentration (1000 UI/ml) est ajoutée au surnageant de transduction. Les titres en particules virales SFV sont similaires aux titres obtenus en l'absence de DNase I, ce qui suggère une transduction plus qu'une seconde transfection. Toutefois, un tel résultat pourrait être obtenu
20 dans l'hypothèse où le plasmide serait encapsulé dans les cellules transfectées après son entrée et délivrées ensuite dans la cellule transduite. Pour contrôler ce phénomène éventuel, les cellules cibles sont pré-traitées avec de l'actinomycine D à raison d'un microgramme par millilitre, puis incubées avec le surnageant infectieux. L'actinomycine D inhibe l'expression des gènes
25 contrôlée par la RNA POL II, comme le génome du vecteur SFV dans le plasmide pSFV26Sm1 ou m2, mais n'a aucune action sur la réplicase des SFV. Une expression similaire de la GFP est observée en présence ou en l'absence d'actinomycine D, ce qui confirme que c'est bien un ARN qui est transféré (voir tableau 2).

On vérifie ensuite si l'expression de la GFP est bien due à l'expression des vecteurs SFV ou à une pseudo-transduction dans les cellules cibles. En effet, certaines publications (6) ont montré que la GFP pouvait être transférée passivement par l'intermédiaire de particules rétrovirales indépendamment de toute expression. Pour s'assurer du contraire, les cellules cibles sont pré-traitées par deux inhibiteurs de traduction, respectivement la généticine et la puromycine. Après traitement, les cellules cibles montrent une expression de la GFP à peine détectable ce qui montre que la GFP observée résulte d'une traduction et non d'un transfert passif (tableau 2). En outre, la co-transfection d'un plasmide pEGFPC1 exprimant fortement la GFP avec un plasmide codant pour la VSV-G ne conduit à aucune pseudo-transduction de la GFP. De la même manière, les surnageants provenant des cellules transfectées avec des vecteurs SFV seuls n'induisent pas l'expression de la GFP, ce qui prouve que la VSV-G doit être présente pour promouvoir la formation des pseudoparticules. Pour confirmer que l'ARN de SFV est protégé dans les vésicules VSV-G, les surnageants sont traités avec de la RNase A, avant transduction. Il apparaît que le traitement par la RNase A n'a pas d'effet sur les titres infectieux confirmant que l'ARN de SFV est véritablement protégé (tableau 2). Au vu de l'ensemble de ces résultats, on déduit que l'expression de la GFP dans les cellules cibles est due à une véritable transduction par les particules virales SFV.

| | Non traité | Actinomycine D | DNase I | RNase I | Généticine | Puromycine |
|----------------------------|-----------------|-------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------|
| Titre viral BHK 21 (IP/ml) | 5×10^5 | 7.5×10^5 | 7×10^5 | N.D. | N.D. | N.D. |
| Titre viral 293T (IP/ml) | 3×10^4 | N.D. | 3×10^4 | 2×10^4 | 9×10^3 | 0 |

Tableau 2

EXEMPLE 2 :

I/ METHODES

5

1/ Constructions :

Les constructions décrites dans l'exemple 1 ont été utilisées.

Deux autres constructions dérivées, présentant une substitution du promoteur CMV par le promoteur procaryote SP6, ont également été utilisées :

- 10 - La première construction, spSFV26Sm1, est directement dérivée de SFV26Sm1.
- La deuxième construction, spSFV26Sm1 Ψ , est obtenue par digestion Bgl II-Sma I d'un plasmide pSFV1 (Invitrogen®), au sein duquel est
- 15 cloné un fragment Bgl II- Hpa I du plasmide pIRES2 GFP (Clontech®), modifié par introduction d'un fragment PCR contenant l'extrémité 3' du
- gène nsp4 et généré en utilisant les amorces 26Sm1F et 26Sm1R (cf. exemple 1, section 2a).

20 Ces constructions sont transcrites *in vitro* puis les ARN sont introduits par électroporation dans les cellules productrices. La transcription *in vitro* est réalisée après linéarisation des plasmides par coupure BstB I. La transcription est réalisée en présence d'analogue de coiffe (Invitrogen®), de polymérase SP6 (Invitrogen®) et de ribonucléotides (Promega®).

2/ Cellules :

- 25 Les cellules productrices de rétrovirus recombinants, dérivées de cellules 293, phoenix® (http://www.stanford.edu/group/nolan/retroviral_systems/phx.html), sont cultivées en milieu DMEM (GIBCO) en présence de sérum de veau fœtal décomplémenté (Abcys).

Les cellules productrices sont transfectées à l'aide des plasmides SFV26Sm1 ou 26Sm2, à raison de 4 µg d'ADN pour $5 \cdot 10^5$ cellules, dans un puit de plaque six puits. La transfection est réalisée en utilisant le phosphate de calcium (Calcium Phosphate transfection kit, Invitrogen®).

- 5 Pour les deux constructions exprimant les vecteurs SFV sous forme d'ARN, la transfection est réalisée par électroporation: 40 µl de réplicons produits *in vitro* sont mis en présence de $40 \cdot 10^5$ cellules et électroporés en utilisant le système EasyjecT Plus (Equibio®).

- 20 heures après la transfection, quelle que soit la méthode de transfection
10 utilisée, le milieu est changé. 16 heures après ce changement, le milieu est récolté pour réaliser les infections. Lors de la récolte, le milieu est filtré à l'aide de filtres 0,45 µm (Millipore®).

3/ Infections:

- 15 Les surnageants filtrés sont utilisés pour infecter des cellules 293T, mises en culture dans des plaques 12 puits. L'infection est réalisée en présence d'une polycation nécessaire aux interactions virus/cellules, le polybrène (Sigma®) à 5 µg/ml. Le jour de l'infection, un puit de cellules cibles 293T est trypsinisé pour comptage.

- 20 24 heures après l'infection, les cellules sont trypsinisées pour un passage en cytométrie de flux (FACScalibur, Becton-Dickinson®). Le pourcentage de cellules exprimant la GFP, rapporté au nombre de cellules au jour de l'infection, permet de calculer un titre de particules recombinantes (IP/ml) (Tableau 3).

25

4/ Contrôles:

Des contrôles, identiques à ceux réalisés dans l'exemple 1, ont été réalisés:

- 10 µg par ml de RNase A (Sigma®),
- 1 µg par millilitre d'actinomycine D (Sigma®),

- 100 unités par millilitre de DNase I (Invitrogen®),
- 1 mg par millilitre de généticine (Sigma®).

II/ RÉSULTATS

5

1/ Infections :

Les résultats des infections sont rapportés dans le Tableau 3.

IP/ml: particules infectieuses par ml; NR: non réalisé.

| Plasmides | Aucun traitement | Rnase A | Dnase I | Actinomycine D | Généticine |
|-----------------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|----------------|
| SFV 26Sm1 | 9.10^3 IP/ml | 7.10^3 IP/ml | 5.10^3 IP/ml | $4,5.10^3$ IP/ml | $< 10^2$ IP/ml |
| SFV 26Sm2 | 8.10^3 IP/ml | 6.10^3 IP/ml | $4,5.10^3$ IP/ml | $4,7.10^3$ IP/ml | $< 10^2$ IP/ml |
| spSFV26Sm1 | 7.10^3 IP/ml | 5.10^3 IP/ml | NR | NR | NR |
| spSFV 26Sm1 $\Delta\psi$ | 6.10^3 IP/ml | 4.10^3 IP/ml | NR | NR | NR |

10

Tableau 3

- La présence de cellules exprimant la GFP confirme la possibilité de mobiliser les ARN recombinants SFV par le truchement d'une particule rétrovirale. Cependant, les faibles titres observés indiquent qu'il est nécessaire de contrôler
- 15 la cytotoxicité du vecteur SFV pour obtenir des titres plus importants. En effet, il existe un antagonisme entre la production des ARN du SFV et la production des protéines rétrovirales. Ces dernières voient leur production diminuer lorsque la production des protéines du SFV augmente. Plusieurs mutants des SFV ont, à ce jour, été décrits et pourront être utilisés avec profit (7).
- 20 La présence ou l'absence de la séquence d'encapsulation des rétrovirus ne semble pas avoir d'influence importante sur l'efficacité de l'encapsulation. Ici,

l'importante concentration intracellulaire en ARN semble avoir un rôle déterminant pour promouvoir l'encapsidation, en accord avec les observations de Muriaux *et al.* (8). L'influence de la séquence rétrovirale psi devra être réévaluée dans le contexte de vecteurs à toxicité réduite.

5

Par ailleurs, ces résultats semblent indiquer qu'il existe probablement une contamination des productions de rétrovirus recombinants lorsque l'on utilise un système "helper" basé sur les vecteurs SFV (9, 10). Ces contaminants sont formés de particules rétrovirales contenant soit les vecteurs SFV servant à
10 exprimer les séquences de transcomplémentation des rétrovirus, soit les vecteurs SFV comprenant la séquence du rétrovirus recombinant. Cette observation remet en cause l'utilisation de ces modes de production des vecteurs rétroviraux à des fins cliniques, contrairement aux particules virales de l'invention.

15

BIBLIOGRAPHIE

1. Rolls, M.M., Webster, P., Balba, N.H. & Rose, J.K. Novel infectious particles generated by expression of the vesicular stomatitis virus glycoprotein from a self-replicating RNA. *Cell* 79, 497-506. (1994).
-
2. Rolls, M.M., Haglund, K. & Rose, J.K. Expression of additional genes in a vector derived from a minimal RNA virus. *Virology* 218, 406-411. (1996).
3. Russell SJ, Cosset FL. Modifying the host range properties of retroviral vectors. *J Gene Med* 1, 300-11. (1999).
4. Salonen A, Vasiljeva L, Merits A, Magden J, Jokitalo E, Kaariainen L. Properly folded nonstructural polyprotein directs the semliki forest virus replication complex to the endosomal compartment. *J Virol.* 77, 1691-702. (2003).
5. Naldini, L. et al. In vivo gene delivery and stable transduction of non-dividing cells by a lentiviral vector. *Science* 272, 263-267 (1996).
6. Liu, M.L., Winther, B.L. & Kay, M.A. Pseudotransduction of hepatocytes by using concentrated pseudotyped vesicular stomatitis virus G glycoprotein (VSV-G)-Moloney murine leukemia virus-derived retrovirus vectors: comparison of VSV-G and amphotropic vectors for hepatic gene transfer. *J Virol* 70, 2497-2502. (1996).
7. Lundstrom K, Abenavoli A, Malgaroli A, Ehrenguber MU. Novel semliki forest virus vectors with reduced cytotoxicity and temperature sensitivity for long-term enhancement of transgene expression. *Mol Ther.* 2, 7202-9. (2003).
8. Muriaux, D., J. Mirro, et al. . RNA is a structural element in retrovirus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5246-51. (2001).
9. Wahlfors JJ, Xanthopoulos KG, Morgan RA. Semliki Forest virus-mediated production of retroviral vector RNA in retroviral packaging cells. *Hum Gene Ther* 8, 2031-41. (1997)
10. Li KJ, Garoff H. Packaging of intron-containing genes into retrovirus vectors by alphavirus vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 3650-4. (1998).

REVENDICATIONS

- 1/ Particule virale constituée d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux caractérisée en ce que les éléments structuraux de ladite particule ne sont pas codés par le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus.
- 2/ Particule virale selon la revendication 1, caractérisée en ce que les éléments structuraux correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G seule.
- 3/ Particule virale selon la revendication 1, caractérisée en ce que les éléments structuraux correspondent aux protéines structurales d'un rétrovirus.
- 4/ Particule selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'alpha-virus est un virus de la forêt de SEMLIKI.
- 5/ Particule selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient la séquence de packaging étendue des vecteurs MLV.
- 6/ Particule selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus est dénué de séquence psi.
- 7/ Particule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus comporte un promoteur eucaryote positionné en 5'.
- 8/ Particule selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le vecteur dérivé d'alpha-virus contient un promoteur p26S muté.

REVENDICATIONS

- 1/ Particule virale constituée d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la répliation,
- 5 par délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux caractérisée en ce que les éléments structuraux de ladite particule ne sont pas codés par le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus.
- 2/ Particule virale selon la revendication 1, caractérisée en ce que les éléments
- 10 structuraux correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G seule.
- 3/ Particule virale selon la revendication 1, caractérisée en ce que les éléments structuraux correspondent aux protéines structurales d'un rétrovirus.
- 15 4/ Particule selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'alpha-virus est un virus de la forêt de SEMLIKI.
- 5/ Particule selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient la séquence de packaging
- 20 étendue des vecteurs MLV.
- 6/ Particule selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus est dénué de séquence psi.
- 25 7/ Particule selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que le génome du vecteur dérivé d'alpha-virus comporte un promoteur eucaryote positionné en 5'.

9/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour infecter une cellule eucaryote.

- 5 10/ Composition pharmaceutique comprenant la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8.

11/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

10

12/ Procédé d'obtention de particules virales, constituées d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux consistant :

- 15 - à exprimer en *trans*, dans une lignée cellulaire, les gènes codant les éléments structuraux non issus de l'alpha-virus et le vecteur dérivé d'alpha-virus,
- à récupérer les particules virales présentes dans le surnageant de la culture cellulaire.

20

13/ Procédé selon la revendication 12, caractérisée en ce que les éléments structuraux correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G.

8/ Particule selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisée en ce que le vecteur dérivé d'alpha-virus contient un promoteur p26S muté.

9/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour
5 infecter une cellule eucaryote *in vitro*.

10/ Composition pharmaceutique comprenant la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8.

10 11/ Utilisation de la particule virale objet de l'une des revendications 1 à 8 pour la fabrication d'un médicament destiné au traitement du cancer.

12/ Procédé d'obtention de particules virales, constituées d'éléments structuraux non issus d'un alpha-virus et contenant un vecteur dérivé
15 d'alpha-virus rendu défectif pour la réplication, par délétion ou remplacement par au moins un transgène, des gènes structuraux consistant :

- à exprimer en *trans*, dans une lignée cellulaire, les gènes codant les éléments structuraux non issus de l'alpha-virus et le vecteur dérivé d'alpha-virus,
- 20 - à récupérer les particules virales présentes dans le surnageant de la culture cellulaire.

13/ Procédé selon la revendication 12, caractérisée en ce que les éléments structuraux correspondent à la protéine d'enveloppe VSV-G.

14/ Procédé selon la revendication 13, caractérisé en ce que l'expression en *trans* est obtenue par co-transfection d'une lignée cellulaire par le vecteur d'expression de l'enveloppe VSV-G et le vecteur dérivé d'alpha-virus, la co-transfection étant effectuée en deux étapes distinctes respectivement, la
5 transfection de la lignée par le vecteur exprimant le gène de l'enveloppe VSV-G, puis une seconde transfection par le vecteur dérivé d'alpha-virus.

15/ Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que la lignée cellulaire transfectée est une lignée de cellules 293T.

10

16/ Procédé selon la revendication 12, caractérisé en ce que les éléments structuraux correspondent aux protéines structurales d'un rétrovirus.

17/ Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'expression en
15 *trans* est obtenue par transfection d'une lignée cellulaire d'encapsidation, productrice de rétrovirus défectifs pour la réplication, par le vecteur dérivé d'alpha-virus.

18/ Procédé selon la revendication 17, caractérisé en ce que la lignée cellulaire
20 d'encapsidation est obtenue par transfection stable d'une lignée cellulaire par un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de rétrovirus et d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus.

19/ Procédé selon la revendication 16, caractérisé en ce que l'expression en
25 *trans* est obtenue par triple transfection d'une lignée cellulaire 293 T, par introduction d'un premier élément viral exprimant les gènes *GAG* et *POL* de rétrovirus, d'un second élément viral exprimant le gène *ENV* de rétrovirus et du vecteur dérivé d'alpha-virus.

20/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 19, caractérisé en ce que l'alpha-virus est un virus de la forêt de SEMLIKI.

21/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 20, caractérisé en ce que le
5 génome du vecteur dérivé d'alpha-virus contient la séquence de packaging étendue des vecteurs MLV.

22/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 21, caractérisée en ce que le
10 génome du vecteur dérivé d'alpha-virus est dénué de séquence psi.

23/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 22, caractérisé en ce que le
génome du vecteur dérivé d'alpha-virus comporte un promoteur eucaryote
positionné en 5'.

15 24/ Procédé selon l'une des revendications 12 à 23, caractérisée en ce que le
vecteur dérivé d'alpha-virus contient un promoteur p26S muté.

1/2

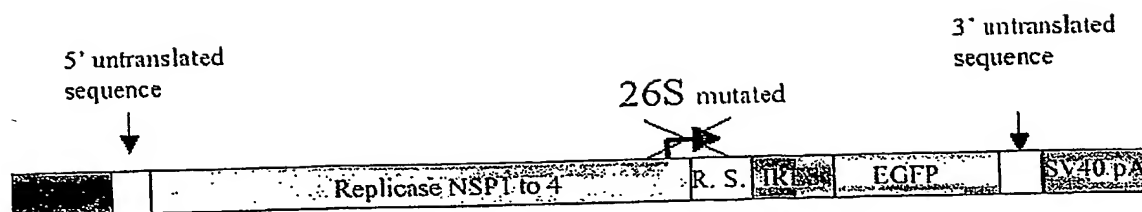


Figure 1

| | |
|-----------------|---|
| Wt 26S promoter | C CTC TAC GGC GGT CCT AGA TTG GTG CGT TAA |
| | L Y G G P R L V R STOP |
| 26Sm1 | C CTC TAC GGC GGT CCT AGA TTA GTT CGT TAA |
| | L Y G G P R L V R STOP |
| 26Sm2 | C CTG TAC GGC GGT CGT AGA TTA GTT CGC TAG |
| | L Y G G R R L V R STOP |

Figure 2

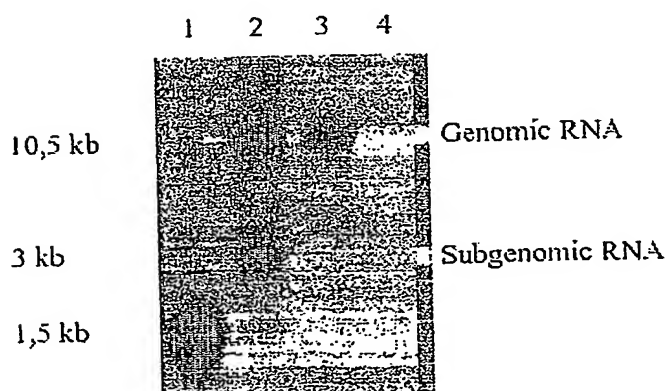


Figure 3

2/2

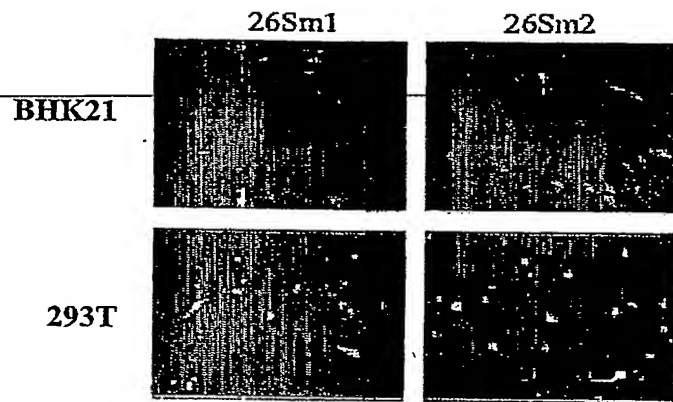


Figure 4

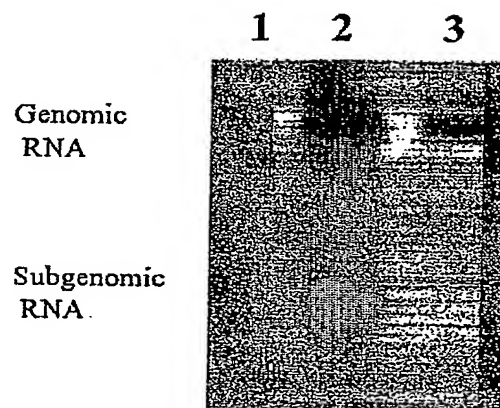


Figure 5

SEQUENCE LISTING

<110> GENETHON UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS

<120> PARTICULES VIRALES CONTENANT UN VECTEUR DERIVE D'ALPHA-VIRUS ET PROCEDE
DE PREPARATION DE LADITE PARTICULE VIRALE

<130> G143-B-19925 FR

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amorce 5' LNCX Psi 2a

<400> 1

gggaccaccg acccaccacc

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amorce 3' LNCX Psi 2b

<400> 2

gatactcatc ctgtctcttg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amorce 26Sm1F

<400> 3

atcctcgaag atctaggg

18

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amorce 26Sm1R

<400> 4

caatatcgat tactagcgaa ctaatctagg a

31

<210> 5

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> amorce 26Sm2R

<400> 5

atatcgatta ctagcgaact aatctacgac ccccgtaaag gtgt

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1.../1...

(À fournir dans le cas où les demandeurs et les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)



Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

| | |
|--|------------------|
| Vos références pour ce dossier (facultatif) | G143-B-19.925 FR |
| N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL | 03.50951 |

TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)

PARTICULES VIRALES CONTENANT UN VECTEUR DERIVE D'ALPHA-VIRUS ET PROCEDE DE PREPARATION DE LADITE PARTICULE VIRALE

LE(S) DEMANDEUR(S) :

GENETHON
1 Bis rue de l'Internationale
91000 EVRY

UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS
3 Rue des Tanneurs
BP 4103
37041 TOURS CEDEX 1

DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :

| | | |
|-------------------------------------|----------------------|------------------------------|
| 1 | Nom | PAGES |
| | Prénoms | Jean-Christophe |
| Adresse | Rue | Allée des Huraudières |
| | Code postal et ville | 3 7 4 0 0 LUSSAULT SUR LOIRE |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| 2 | Nom | |
| | Prénoms | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |
| 3 | Nom | |
| | Prénoms | |
| Adresse | Rue | |
| | Code postal et ville | |
| Société d'appartenance (facultatif) | | |

S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.

DATE ET SIGNATURE(S)

DU (DES) DEMANDEUR(S)

OU DU MANDATAIRE

(Nom et qualité du signataire)

Le Mandataire
VUILLERMOZ Bruno (92-2047-CPI)

FR 04 50631



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.